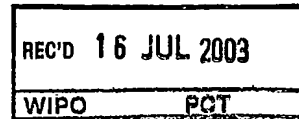


Rec'd PCT/PTC 06 DEC 2004 #7

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND **PCT/EP** 03/05847
25. 06. 2003

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 25 844.9

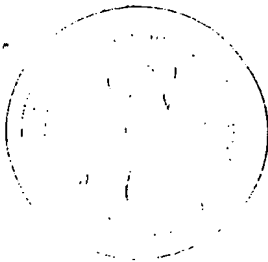
Anmeldetag: 4. Juni 2002

Anmelder/Inhaber: Prof. Dr. Florian L a n g , Tübingen/DE

Bezeichnung: sgk und nedd als diagnostische und therapeutische targets

IPC: C 12 Q, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.



München, den 13. Juni 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Dzierzon



Patentanwälte Ruff, Wilhelm, Beier, Dauster & Partner
European Patent and Trademark Attorneys

Kronenstraße 30 Fon +49 (0)711 222 976-0
D-70174 Stuttgart +49 (0)711 228 11-0
Deutschland/Germany Fax +49 (0)711 222 976-76
 +49 (0)711 228 11-22
e-mail mail@kronenpat.de
www.kronenpat.de

Anmelder: Prof. Dr. Florian Lang
Gmelinstraße 5
Physiologisches Institut I

72076 Tübingen

Unser Zeichen: P 41 747 DE

04. Juni 2002
TM/Sn/nw

Beschreibung

sgk und nedd als diagnostische und therapeutische targets

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung einer Substanz zum diagnostischen Nachweis von sgk (serum and glucocorticoid dependent kinase), insbesondere sgk1 und/oder sgk3, und/oder Proteinkinase B (PKB) und/oder nedd (neural precursor cell expressed developmentally downregulated gene), insbesondere nedd4-2. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung eines Wirkstoffes zur Beeinflussung des Glucosetransportes insbesondere für die therapeutische Behandlung von Erkrankungen, die im Zusammenhang mit einer gestörten Glucoseabsorption stehen, sowie zur Gewichtserhöhung von Tieren bei der Mast. Die Erfindung betrifft außerdem ein Diagnosekit.

Der intestinale und renale Transport von Glucose wird durch den Na⁺-gekoppelten Transporter sglt1 (sodium glucose transporter) in der apikalen Membran der Epithelzellen bewerkstelligt. Ist dieser Glucosetransport gestört, kann es zu verschiedenen Erkrankungen wie Fettsucht oder Diabetes mellitus kommen.

Bisher ist wenig über die Regulation des *sglt1* bekannt. Unlängst wurde ein neuartiger Mechanismus aufgedeckt, welcher den renalen epithelialen Na^+ -Kanal ENaC reguliert: der Kanal wird durch die Ubiquitinligase *nedd4-2* ubiquitiniert und damit für Internalisierung und Abbau vorbereitet [Debonneville C, Flores SY, Kamynina E, Plant PJ, Tauxe C, Thomas MA, Munster C, Chraibi A, Pratt JH, Horisberger JD, Pearce D, Loffing J, Staub O. Phosphorylation of *nedd4-2* by *sgk1* regulates epithelial Na^+ channel cell surface expression. EMBO J. 2001; 20: 7052-7059]. *nedd4-2* wird durch die Serum- und Glucocorticoid-induzierbare Kinase 1 (*sgk1*) phosphoryliert und damit inaktiviert. Damit ist *sgk1* ein potenter Stimulator des renalen epithelialen Na^+ -Kanals [De la Rosa et al. 1999, Boehmer et al. 2000, Chen et al. 1999, Náray-Fejes-Tóth et al. 1999, Lang et al. 2000, Chigaev et al. 2000, Wagner et al. 2001].

Allgemein sind Kinasen Proteine, die eine Phosphatgruppe auf individuelle Substrate übertragen. Die Serum- und Glucocorticoid-abhängige Kinase (*sgk*) wurde ursprünglich aus Rattenmammarkarzinomzellen kloniert (Webster MK, Goya L, Firestone GL, Y. Biol. Chem. 268 (16): 11482-11485, 1993; Webster MK, Goya L, Ge Y, Maiyar AC, Firestone GL, Mol. Cell. Biol. 13 (4): 2031-2040, 1993).

Die *sgk1* wurde ursprünglich als Glucocorticoid-sensitives Gen kloniert [Webster MK, Goya L, Ge Y, Maiyar AC, Firestone GL: Characterization of *sgk*, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. Mol Cell Biol 1993; 13: 2031-2040]. Eine Reihe von Untersuchungen deckten auf, daß die *sgk1* unter dem Einfluß einer Vielzahl von Stimuli steht [Lang F, Cohen P. Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms. Science STKE. 2001 Nov 13; 2001 (108): RE17], wie unter anderem der Mineralcorticoide [Chen SY, Bhargava A, Mastroberardino L, Meijer OC, Wang J, Buse P, Fire-

- stone GL, Verrey F, Pearce D: Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2514-2519; Náray-Fejes-Tóth A, Canessa C, Cleaveland ES, Aldrich G, Fejes-Tóth G: sgk is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial Na⁺ channels. *J Biol Chem* 1999; 274: 16973-16978; Park J, Leong ML, Buse P, Maiyar AC, Firestone GL, Hemmings BA: Serum and glucocorticoid-inducible kinase (sgk) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *EMBO J* 1999; 18: 3024-3033; Brenan FE, Fuller PJ. Rapid upregulation of serum and glucocorticoid-regulated kinase (sgk) gene expression by corticosteroids in vivo. *Mol Cell Endocrinol*. 2000; 30: 166: 129-36; Cowling RT, Birnboim HC. Expression of serum- and glucocorticoid-regulated kinase (sgk) mRNA is up-regulated by GM-CSF and other proinflammatory mediators in human granulocytes. *J Leukoc Biol*. 2000; 67: 240-248]. sgk1 wird durch insulin like growth factor IGF1, durch Insulin und oxidativen Stress über eine Signalkaskade durch Phosphoinositol-3-Kinase (pi3-Kinase) und Phosphoinositol-abhängige Kinase (pdk1) stimuliert [Kobayashi T, Cohen P: Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (pdk1) and pdk2. *Biochem J* 1999; 339: 319-328; Park J, Leong ML, Buse P, Maiyar AC, Firestone GL, Hemmings BA: Serum and glucocorticoid-inducible kinase (sgk) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *EMBO J* 1999; 18: 3024-3033; Kobayashi T, Deak M, Morrice N, Cohen P. Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase. *Biochem. J*. 1999; 344: 189-197]. Die Aktivierung der sgk1 durch die pdk1 involviert eine Phosphorylierung am Serin der Position 422. Mutation dieses Serins in ein Aspartat (^{S422D}sgk1) führt zu einer konstitutiv aktiven Kinase [Kobayashi T, Cohen P: Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is

mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (pdk1) and pdk2. *Biochem J* 1999; 339: 319-328].

- Später wurden zwei Isoformen der sgk1, die sgk2 und sgk3 kloniert [Kobayashi T, Deak M, Morrice N, and Cohen P. 1999. Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase. *Biochem J.* 344:189-197]. Alle drei sgk-Isoformen sowie die Protein kinase B werden über PI3 Kinase und pdk1 aktiviert [Kobayashi, T., and Cohen, P. 1999. Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositol 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem J.* 339:319-328].

Ziel der Erfindung ist es, neue diagnostische und therapeutische Anwendungen für die Regulation der Glucoseaufnahme bereitzustellen. Zudem ist es ein Ziel der Erfindung, Anwendungen bereitzustellen, die über die Regulation der Glucoseaufnahme das Körpergewicht von Tieren erhöhen.

- Überraschenderweise konnte in Zwei-Elektroden-Spannungsklemme-Versuchen gezeigt werden, daß nedd4-2 auch den renalen und intestinalen Na⁺-Glucosetransporter sgt inaktiviert und daß diese Wirkung durch die sgk1 und/oder sgk3 und/oder PKB unterbunden wird. Da eine beschleunigte Glucoseabsorption beispielsweise die Entwicklung einer Fettsucht begünstigt, ergibt sich daraus, daß nedd4-2, sgk1, sgk3 und PKB bei der Entwicklung einer Fettsucht eine kausale Rolle spielen. Durch Nachweis von nedd4-2 und/oder sgk1 und/oder sgk3 und/oder PKB kann beispielsweise die Ursache der Fettsucht identifiziert und durch adäquate therapeutische und prophylaktische Maßnahmen behandelt bzw. verhindert werden. Die Fettsucht und auch die Hyperglykämie, welche durch beschleunigte intestinale Glucoseabsorption ausgelöst werden, begünstigen auch die Entwicklung eines Diabetes melli-

tus. Schließlich würde eine gleichzeitige Dysregulation der renalen Na^+ -Kanäle die Entwicklung einer Hypertonie nach sich ziehen. Fettsucht, Hypertonie und die Entwicklung eines Diabetes mellitus sind Schlüsselbefunde des sogenannten metabolischen Syndroms.

5

Umgekehrt ergibt sich, daß eine Inhibierung von *sgk1* und/oder *sgk3* und/oder PKB wiederum zu einer Hemmung des renalen und intestinalen Na^+ -Glucosetransporters *sglt* führt.

- 10 Demzufolge wird die erfindungsgemäße Aufgabe durch den Gegenstand der unabhängigen Ansprüche 1, 9, 17, 22 und 24 gelöst. Bevorzugte Ausführungen sind in den abhängigen Ansprüchen 2 bis 8, 10 bis 16, 18 bis 21, 23 und 25 bis 33 genannt. Der Inhalt aller dieser Ansprüche wird hiermit durch Bezugnahme zum Inhalt der Beschreibung gemacht.

15

- Erfindungsgemäß wird die Verwendung mindestens einer Substanz zum Nachweis der Expression und/oder Funktion von aktivierter und/oder inaktiver *sgk*, insbesondere *sgk1* und/oder *sgk3*, und/oder PKB und/oder *nedd*, insbesondere *nedd4-2*, beansprucht. Damit ist insbesondere auch
- 20 eine Diagnose von Erkrankungen, die mit einem gestörten Glucose-transport in Verbindung stehen, möglich. Vorzugsweise handelt es sich bei der Substanz mindestens um eine aus der Gruppe von Antikörpern und/oder Nukleotiden. Beispielsweise kann es sich um einen Antikörper handeln, der gegen *sgk1* und/oder *sgk3* und/oder PKB gerichtet ist, und
- 25 in einem dem Fachmann bekannten Nachweisverfahren, wie z. B. ELISA (enzyme-linked-immuno sorbent assay) eingesetzt werden kann. Bei solchen Immunoassays wird der gegen das zu bestimmende Antigen (*sgk1* und/oder *sgk3* und/oder PKB) gerichtete spezifische Antikörper (bzw. bei Antikörperbestimmungen homologe Testantigene) an eine
- 30 Trägersubstanz (z. B. Cellulose, Polystyrol) gebunden, an der sich nach der Inkubation mit der Probe Immunkomplexe bilden. In einem nachfolgenden Schritt wird diesen Immunkomplexen ein markierter Antikörper

zugeführt. Durch Zugabe eines chromogenen Substrates zum Reaktionsansatz können die Immunokomplex-gebundenen Enzym-Substratkomplexe sichtbar gemacht bzw. die Antigenkonzentration in der Probe über eine photometrische Bestimmung der Immunkomplex-gebundenen

5 Markerenzyme durch Vergleich mit Standards bekannter Enzymaktivität ermittelt werden. Wie bereits oben erwähnt, können auch Nukleotide, insbesondere Oligonukleotide, für den diagnostischen Nachweis verwendet werden, die mit Hilfe der sogenannten Polymerase-Kettenreaktion geeignet sind, über ein molekulargenetisches Verfahren, bei

10 dem selektiv bestimmte DNA-Abschnitte amplifiziert werden, einen quantitativen Nachweis von beispielsweise sgk1 zu erbringen.

Vorzugsweise werden Antikörper gegen die phosphorylierte und nicht phosphorylierte sgk1-Konsensussequenz im nedd-Protein eingesetzt.

15 Auch ist es möglich, daß inaktivierende Mutationen in der sgk1-Konsensussequenz im nedd-Protein (z. B. ^{S338D}nedd4-2 oder ^{S444D}nedd4-2) detektiert werden. Ferner wird eine aktivierende ^{S422D}sgk1-Mutation in der DNA der Patienten detektiert. Bei einer weiteren Verwendung werden die entsprechenden Mutationen in der RNA der Patienten detektiert.

20 Schließlich werden die entsprechenden Mutationen im sgk1- und im nedd4-2-Protein der Patienten detektiert.

Bei den zu diagnostizierenden Erkrankungen, die mit einem gestörten Glucosetransport in Verbindung stehen, handelt es sich insbesondere

25 um das metabolische Syndrom bzw. um Fettsucht.

Erfindungsgemäß wird weiterhin die Verwendung mindestens eines Wirkstoffes zur Beeinflussung des, insbesondere intestinalen und renalen, Glucosetransportes beansprucht. Vorzugsweise wird durch den

30 Wirkstoff eine Beeinflussung mindestens einer sgk, insbesondere sgk1 und/oder sgk3, und/oder PKB und/oder eine Beeinflussung mindestens einer nedd, insbesondere nedd4-2, erreicht. Vorzugsweise ist der Wirk-

stoff gegen eine sgk, insbesondere eine sgk1 und/oder sgk3, und/oder PKB und/oder eine nedd, insbesondere nedd4-2, gerichtet. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Wirkstoff gegen Aktivatoren, Inhibitoren, Regulatoren und/oder biologische Vorläufer einer sgk, insbesondere von sgk1 und/oder sgk3, und/oder PKB und/oder einer nedd, insbesondere von nedd4-2, gerichtet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Wirkstoff ein Polynukleotid, welches ein Peptid, vorzugsweise ein Polypeptid, kodiert, wobei dieses Peptid die Expression und/oder Funktion einer sgk, insbesondere sgk1 und/oder sgk3, und/oder PKB und/oder einer nedd, insbesondere nedd4-2, beeinflußt.

Der Wirkstoff kann ein „small molecular compound“, vorzugsweise ein „small molecular compound“ mit einem Molekulargewicht < 1.000, sein.

Je nachdem, ob das Ziel eine Behandlung von Erkrankungen, die mit einem gestörten Glucosetransport in Verbindung stehen, oder die Erhöhung des Körpergewichts von Tieren bei der Tiermast ist, müssen die jeweiligen Enzyme unterschiedlich beeinflußt werden. Zur Vorbeugung oder Behandlung von Erkrankungen, die im Zusammenhang mit einer gestörten Glucoseabsorption stehen, soll durch den Wirkstoff eine Inhibition mindestens einer sgk, insbesondere sgk1 und/oder sgk3, und/oder PKB und/oder eine Stimulierung mindestens einer nedd, insbesondere nedd4-2, erreicht werden. Da sgk und PKB Kinasen sind, kommen insbesondere dem Fachmann bekannte Kinaseinhibitoren, wie z. B. Staurosporin und/oder Chelerythrin bzw. eine von deren Analoga in Frage. Da nedd Ligasen sind, kommen für deren Stimulierung Ligaseaktivatoren in Frage. Bevorzugt werden diese Wirkstoffe zur Herstellung eines Medikamentes oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung genutzt. Bei den zu behandelnden Erkrankungen handelt es sich vorzugsweise um ein metabolisches Syndrom, insbesondere um Fettsucht.

Soll dagegen, im Gegensatz zur oben beschriebenen Vorbeugung oder Behandlung von Erkrankungen, bei denen eine Erniedrigung des Glucosetransportes das Ziel ist, eine Steigerung des Glucosetransportes, beispielsweise zur Erhöhung des Körpergewichtes von Tieren bei der Tiermast, erreicht werden, wird durch den Wirkstoff vorzugsweise eine Stimulierung mindestens einer sgk, insbesondere sgk1 und/oder sgk3, und/oder PKB und/oder eine Inhibierung mindestens einer nedd, insbesondere nedd4-2, erreicht. Durch eine Stimulierung von beispielsweise sgk1 kommt es zu einer Inhibierung von beispielsweise nedd4-2, was wiederum zu einem verzögerten Abbau des Glucosetransporters sgl1 führt. Dadurch kommt es wiederum zu einer Steigerung des Glucosetransportes. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Wirkstoff ein sgk1-Aktivator, insbesondere ein Wachstumsfaktor, vorzugsweise IGF1 und/oder Insulin.

15

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Wirkstoff ein Stimulans für die Transkription der sgk1 und/oder sgk3 und/oder PKB, vorzugsweise mindestens ein Glucocorticoid, Mineralcorticoid, Gonadotropin und/oder Cytokin.

20

Die Erfindung betrifft auch ein Diagnosekit. Dieser umfaßt mindestens eine Substanz zum Nachweis der Expression und/oder Funktion von aktiviertem und/oder inaktivem sgk, insbesondere sgk1 und/oder sgk3, und/oder PKB und/oder nedd, insbesondere nedd4-2, zur Diagnose von Erkrankungen, die mit einem gestörten Glukosetransport in Verbindung stehen. Vorzugsweise handelt es sich bei den Erkrankungen um das metabolische Syndrom, insbesondere um Fettsucht.

Die Erfindung umfaßt ferner eine Zusammensetzung, vorzugsweise eine pharmazeutische Zusammensetzung, die mindestens einen Wirkstoff enthält, der den Glukosetransport, insbesondere den intestinalen und/oder renalen Glukosetransport, beeinflusst, und ggf. einen pharmazeuti-

30

5 schen Träger. Besonders bevorzugt beeinflusst der Wirkstoff mindestens eine sgk und/oder PKB und/oder mindestens eine nedd. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform beeinflusst der Wirkstoff Aktivatoren, Inhibitoren, Regulatoren und/oder biologische Vorläufer einer sgk, insbesondere von sgk1 und/oder sgk3, und/oder PKB und/oder einer nedd, insbesondere von nedd4-2.

10 Mit Vorteil ist der Wirkstoff ein Polynukleotid, welches ein Peptid, vorzugsweise ein Polypeptid, kodiert, wobei dieses Peptid die Expression und/oder Funktion einer sgk, insbesondere sgk1 und/oder sgk3, und/oder PKB und/oder einer nedd, insbesondere nedd4-2, beeinflusst. Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Wirkstoff ein „small molecular compound“, vorzugsweise ein „small molecular compound“ mit einem Molekulargewicht < 1.000.

15 Insbesondere zur Behandlung von Erkrankungen, die mit einem gestörten Glukosetransport in Verbindung stehen, wird durch den Wirkstoff eine Inhibierung mindestens einer sgk oder PKB und/oder eine Stimulierung mindestens einer nedd erreicht. Besonders bevorzugt ist der Wirkstoff zur Behandlung dieser Erkrankungen ein Kinaseinhibitor, vorzugsweise Staurosporin und/oder Chelerythrin bzw. eines von deren Analoga, und/oder ein Ligaseaktivator.

25 Zur Steigerung des Glukosetransports, insbesondere bei der Tiermast, wird durch den Wirkstoff vorzugsweise eine Stimulierung mindestens einer sgk oder PKB und/oder eine Inhibierung mindestens einer nedd erreicht. Mit Vorteil ist der Wirkstoff zur Steigerung des Glukosetransportes ein sgk1-Aktivator, insbesondere ein Wachstumsfaktor, vorzugsweise IGF1, und/oder Insulin. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Wirkstoff ein Stimulans für die Transkription der sgk1 und/oder sgk3 und/oder PKB, vorzugsweise mindestens ein Glucocorticoid, Mineralcorticoid, Gonadotropin und/oder Cytokin.

Die bisherigen Merkmale und weitere Merkmale der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung von bevorzugten Ausführungsformen in Verbindung mit den Unteransprüchen und den Figuren. Hierbei können die einzelnen Merkmale jeweils für sich oder zu mehreren in Kombination miteinander verwirklicht sein.

In den Abbildungen zeigen:

Fig. 1: Regulation des Na⁺-gekoppelten Glucosetransporters sglt1 durch nedd4-2 und sgk1. Arithmetische Mittelwerte ± SEM (n=18). Xenopus-Oocyten wurden mit cRNA von sglt1, nedd4-2 und/oder ^{S422D}sgk1 injiziert. Während Koexpression nedd4-2, die durch Zugabe von 5 mmol Glucose induzierten Ströme herabsetzt, werden die Ströme durch Koexpression von konstitutiv aktiver Kinase ^{S422D}sgk1 signifikant gesteigert.

Fig. 2: Regulation des Na⁺ gekoppelten Glucosetransporters sgk1 durch nedd4-2, die sgk3 und die PKB. Arithmetische Mittelwerte ± SEM. (experimentelles Vorgehen wie in Abbildung 1).

Experiment

25

Expression in Xenopus laevis Oocyten und Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

cRNA der normalen sgk1 [Waldegger S, Barth P, Raber G, Lang F: Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94; 4440-4445]

- und der konstitutiv aktiven sgk1 (^{S422D}sgk1), sgk3 und PKB, [Kobayashi T, Cohen P: Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (pdk1) and pdk2. Biochem J 1999; 339: 319-328], von normalem nedd4-2 [Debonneville C, Flores SY, Kamynina E, Plant PJ, Tauxe C, Thomas MA, Munster C, Chraïbi A, Pratt JH, Horisberger JD, Pearce D, Loffing J, Staub O. Phosphorylation of nedd4-2 by sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. EMBO J. 2001; 20: 7052-7059] und von normalem sglt1 [Hediger MA, Coady MJ, Ikeda TS, Wright EM. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na+/glucose co-transporter. Nature. 1987; 330: 379-381] wurden *in vitro* synthetisiert [Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, Bröer S: The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. Cell Physiol Biochem 2000; 10: 1-12]. Dissektion der *Xenopus laevis* Ovarien, Kollektion und Behandlung der Oocyten wurden bereits detailliert beschrieben [Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, Bröer S: The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. Cell Physiol Biochem 2000; 10: 1-12]. Die Oocyten wurden mit 5 ng von humanem sglt1, 7,5 ng von humaner ^{S422D}sgk1 und/oder sgk3 und/oder PKB und/oder mit 5 ng von *Xenopus* nedd4-2 injiziert. Kontroll-oocyten wurden mit Wasser injiziert. Elektrophysiologische Experimente wurden bei Raumtemperatur 2 Tage nach Injektion der jeweiligen cRNA's durchgeführt. Die durch extrazelluläre Verabreichung von 5 mM Glucose induzierten Ströme wurden mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme [Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, Bröer S: The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. Cell Physiol Biochem 2000; 10: 1-12] gemessen und als Maß für den Glucosetransport genommen. Die Daten wurden bei 10 Hz gefiltert und mit dem MacLab digital to analog converter und software ausgewertet (AD Instruments, Castle Hill, Australia).

Die Kontrollbadlösung enthielt 96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ und 5 mM HEPES, pH 7,4. Alle Substanzen wurden in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Die endgültigen Lösungen wurden mit HCl bzw. NaOH auf pH 7,4 titriert. Die Flußgeschwindigkeit der Superfusionslösung war 20 ml/min und erreichte einen kompletten Lösungswechsel innerhalb von 10 s.

Berechnungen

10

Die Daten werden als arithmetische Mittelwerte \pm SEM angegeben, n ist die Zahl der untersuchten Oocyten. Alle Experimente wurden in mindestens drei verschiedenen Gruppen von Oocyten durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit dem Student t-test auf signifikante Unterschiede getestet. Nur Ergebnisse mit $P < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

Ergebnisse

20

Die Verabreichung von 5 mM Glucose führt in mit sglt1 mRNA injizierten *Xenopus* Oocyten, nicht jedoch in Oocyten, welche mit Wasser injiziert worden waren, zu einem Einwärtsstrom (I_{glc}) von $48,6 \pm 11,5$ nA ($n=18$). In *Xenopus*-Oocyten, welche mit sglt1 mRNA und nedd4-2 mRNA injiziert worden waren, war I_{glc} um 29 ± 10 % auf $25,2 \pm 5,4$ nA ($n=18$) herabgesetzt. Somit wird sglt1 durch die Ubiquitinligase nedd4-2 gehemmt. Die Koexpression von ^{S422D}sgk1 steigerte hingegen I_{glc} um 77 ± 23 % auf $65,4 \pm 10,6$ nA ($n=18$) und verhinderte die Wirkung von nedd4-2. In Oocyten, welche sglt1 zusammen mit sgk1 und nedd4-2 exprimierten, erreichte der Glucose-induzierte Strom $60,5 \pm 9,9$ nA ($n=18$), das sind 61 ± 21 % mehr als der entsprechende Wert in ausschließlich mit sglt1 inji-

zierten Oocyten und 126 ± 23 % mehr als in Oocyten, welche mit sglt1 und nedd4-2 mRNA injiziert worden waren (Abb. 1).

In einer zweiten Serie von Experimenten wurden neben der konstitutiv
5 aktiven ^{S422D}sgk1 (SD) auch die Isoformen der sgk, sgk2 und sgk3 sowie
die Proteinkinase B getestet. Der Glucose-induzierte Strom wurde durch
die Koexpression von ^{S422D}sgk1 um 55 ± 12 % ($n = 44$), von sgk3 um
 117 ± 16 % ($n = 16$) und von PKB um 101 ± 18 % ($n = 24$) gesteigert,
während sgk2 ohne statistisch signifikante Wirkung blieb. Die Koexpres-
10 sion von nedd4-2 senkte den Glucosetransport um 23 ± 4 % ($n = 79$),
verhinderte jedoch nicht die Stimulation durch die zusätzliche Koexpres-
sion von ^{S422D}sgk1 ($+48 \pm 11$ %, $n = 48$), von sgk3 ($+114 \pm 26$ %, $n = 16$)
und von PKB ($+107 \pm 20$ %, $n = 24$). sgk2 blieb wiederum ohne signifi-
kante Wirkung.

15

Patentansprüche

1. Verwendung mindestens einer Substanz zum Nachweis der Expression und/oder Funktion von aktivierter und/oder inaktiver sgk, insbesondere sgk1 und/oder sgk3, und/oder PKB und/oder nedd, insbesondere nedd4-2, zur Diagnose von Erkrankungen, die mit einem gestörten Glucosetransport in Verbindung stehen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanz mindestens eine aus der Gruppe von Antikörpern und Nukleotiden ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß Antikörper gegen die phosphorylierte und nicht phosphorylierte sgk1-Konsensussequenz im nedd-Protein eingesetzt werden.
4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß inaktivierende Mutationen in der sgk1-Konsensussequenz im nedd-Protein detektiert werden.
5. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die ^{S422D}sgk1 Mutation in der DNA von Patienten nachgewiesen wird.
6. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die ^{S422D}sgk1 Mutation in der RNA von Patienten nachgewiesen wird.
7. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die ^{S422D}sgk1 Mutation im sgk1 Protein von Patienten nachgewiesen wird.

8. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Erkrankungen um das metabolische Syndrom, bzw. um Fettsucht, handelt.
9. Verwendung mindestens eines Wirkstoffes zur Beeinflussung des, insbesondere intestinalen und/oder renalen, Glucosetransportes.
10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß durch den Wirkstoff eine Beeinflussung mindestens einer sgk, insbesondere sgk1 und/oder sgk3, und/oder PKB und/oder eine Beeinflussung mindestens einer nedd, insbesondere nedd4-2, erfolgt.
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff gegen eine sgk, insbesondere eine sgk1 und/oder sgk3, und/oder PKB und/oder eine nedd, insbesondere nedd4-2, gerichtet ist.
12. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff gegen Aktivatoren, Inhibitoren, Regulatoren und/oder biologische Vorläufer einer sgk, insbesondere von sgk1 und/oder sgk3, und/oder PKB und/oder einer nedd, insbesondere von nedd4-2, gerichtet ist.
13. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Polynukleotid ist, welches ein Peptid, vorzugsweise ein Polypeptid, kodiert, wobei dieses Peptid die Expression und/oder Funktion einer sgk, insbesondere sgk1 und/oder sgk3, und/oder PKB und/oder einer nedd, insbesondere nedd4-2, beeinflußt.

14. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein „small molecular compound“, vorzugsweise ein „small molecular compound“ mit einem Molekulargewicht (MG) < 1.000, ist.
15. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß durch den Wirkstoff eine Inhibierung mindestens einer sgk, insbesondere sgk1 und/oder sgk3, und/oder PKB und/oder eine Stimulierung mindestens einer nedd, insbesondere nedd4-2, erfolgt, insbesondere zur Vorbeugung oder Behandlung von Erkrankungen, die im Zusammenhang mit einer gestörten Glucoseabsorption stehen.
16. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Kinaseinhibitor, vorzugsweise Staurosporin und/oder Chelerythrin bzw. eines von deren Analoga, und/oder ein Ligaseaktivator ist.
17. Verwendung mindestens eines Wirkstoffes zur Beeinflussung, insbesondere Inhibierung, mindestens einer sgk oder PKB und/oder zur Beeinflussung, insbesondere Stimulierung, mindestens einer nedd, zur Herstellung eines Medikamentes oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Erkrankungen, die mit einem gestörten Glucosetransport in Zusammenhang stehen.
18. Verwendung nach Anspruch 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Erkrankungen um das metabolische Syndrom, bzw. um Fettsucht, handelt.
19. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß durch den Wirkstoff eine Stimulierung mindestens einer sgk, insbesondere sgk1 und/oder sgk3, und/oder PKB

und/oder eine Inhibierung mindestens einer nedd, insbesondere nedd4-2, erreicht wird zur Steigerung des Glucosetransportes, insbesondere zur Erhöhung des Körpergewichtes von Tieren.

20. Verwendung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein sgk- oder PKB-Aktivator, insbesondere ein Wachstumsfaktor, vorzugsweise IGF1, und/oder Insulin ist.
21. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Stimulans für die Transkription der sgk1 und/oder sgk3 und/oder PKB, vorzugsweise mindestens ein Glucocorticoid, Mineralcorticoid, Gonadotropin und/oder Cytokin ist.
22. Diagnosekit, umfassend mindestens eine Substanz zum Nachweis der Expression und/oder Funktion von aktiviertem und/oder inaktivem sgk, insbesondere sgk1 und/oder sgk3, und/oder PKB und/oder nedd, insbesondere nedd4-2, zur Diagnose von Erkrankungen, die mit einem gestörten Glucosetransport in Verbindung stehen.
23. Diagnosekit nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Erkrankungen um das metabolische Syndrom, bzw. um Fettsucht, handelt.
24. Zusammensetzung, insbesondere pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine wirksame Menge mindestens eines Wirkstoffes, der den Glucosetransport, insbesondere den intestinalen und/oder renalen Glucosetransport, beeinflußt, und ggf. einen pharmazeutischen Träger.

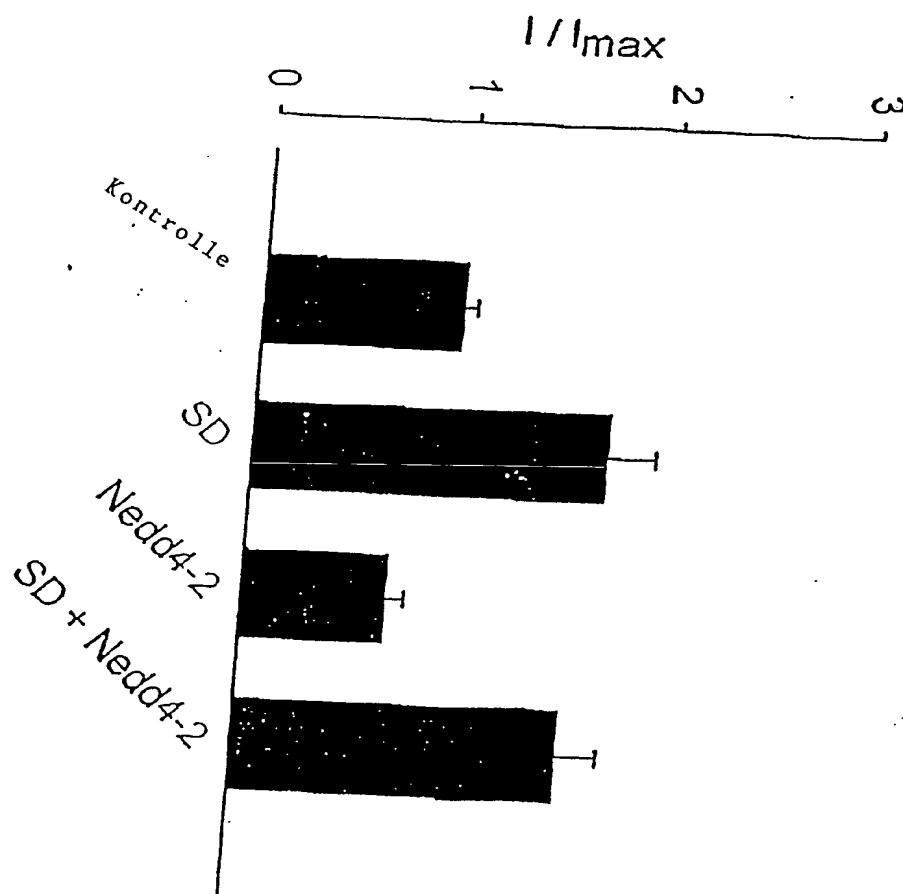
25. Zusammensetzung nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff mindestens eine sgk oder PKB und/oder mindestens eine nedd beeinflusst.
26. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff Aktivatoren, Inhibitoren, Regulatoren und/oder biologische Vorläufer einer sgk, insbesondere von sgk1 und/oder sgk3, und/oder PKB und/oder einer nedd, insbesondere von nedd4-2, beeinflusst.
27. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Polynukleotid ist, welches ein Peptid, vorzugsweise ein Polypeptid, kodiert, wobei dieses Peptid die Expression und/oder Funktion einer sgk, insbesondere sgk1 und/oder sgk3, und/oder PKB und/oder einer nedd, insbesondere nedd4-2, beeinflusst.
28. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 24 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein „small molecular compound“, vorzugsweise ein „small molecular compound“ mit einem Molekulargewicht (MG) < 1.000, ist.
29. Zusammensetzung nach Anspruch 24 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß durch den Wirkstoff eine Inhibierung mindestens einer sgk oder PKB und/oder eine Stimulierung mindestens einer nedd erfolgt.
30. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 24 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Kinaseinhibitor, vorzugsweise Staurosporin und/oder Chelerythrin bzw. eines von deren Analoga, und/oder ein Ligaseaktivator ist.

31. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 24 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß durch den Wirkstoff eine Stimulierung mindestens einer sgk oder PKB und/oder eine Inhibierung mindestens einer nedd erfolgt.
 32. Zusammensetzung nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein sgk- oder PKB-Aktivator, insbesondere ein Wachstumsfaktor, vorzugsweise IGF1, und/oder Insulin ist.
 33. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Stimulans für die Transkription der sgk1 und/oder sgk3 und/oder PKB, vorzugsweise mindestens ein Glucocorticoid, Mineralcorticoid, Gonadotropin und/oder Cytokin ist.
-

Zusammenfassung

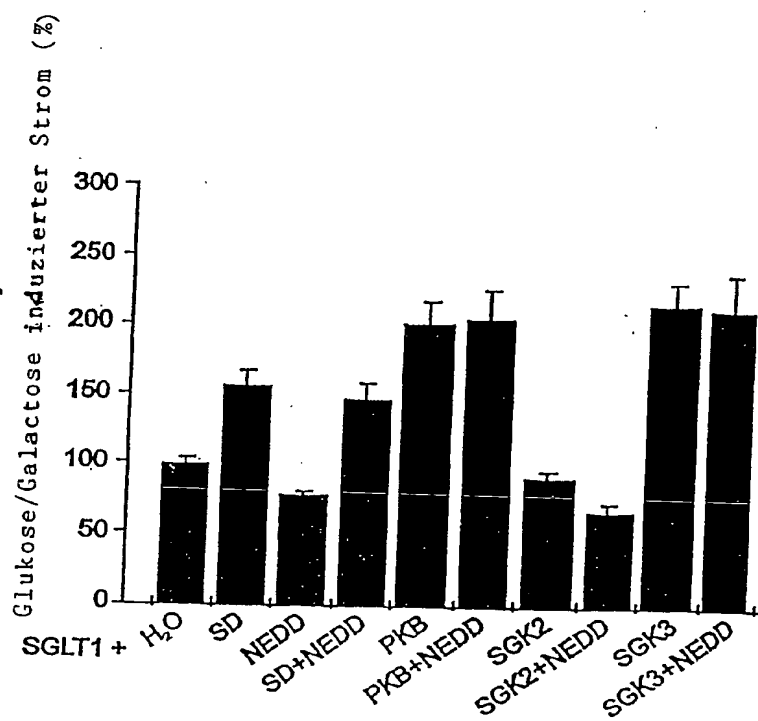
Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung einer Substanz zum diagnostischen Nachweis von sgk, insbesondere sgk1 und/oder sgk3, und/oder PKB und/oder nedd, insbesondere nedd4-2, sowie die Verwendung von Wirkstoffen zur Beeinflussung des Glucosetransportes zur Behandlung von Erkrankungen, die mit einem gestörten Glucosetransport in Verbindung stehen sowie für die Tiermast. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Diagnosekit und eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine wirksame Menge mindestens eines Wirkstoffes, der den Glucosetransport beeinflusst.

Figur 1



BEST AVAILABLE COPY

Figur 2



BEST AVAILABLE COPY